

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-540380

(P2002-540380A)

(43)公表日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード(参考)
G 01 N 33/53		G 01 N 33/53	M 4 B 0 2 4
C 12 N 15/09		33/544	Z 4 B 0 2 9
G 01 N 33/544		33/566	4 B 0 6 3
33/566		37/00	1 0 2 4 H 0 4 5
37/00	1 0 2	C 07 K 17/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号	特願2000-532545(P2000-532545)
(86) (22)出願日	平成11年2月19日(1999.2.19)
(85)翻訳文提出日	平成12年8月21日(2000.8.21)
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 0 3 7 0 7
(87)国際公開番号	W O 9 9 / 4 2 6 0 5
(87)国際公開日	平成11年8月26日(1999.8.26)
(31)優先権主張番号	6 0 / 0 7 5, 6 2 9
(32)優先日	平成10年2月21日(1998.2.21)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	0 9 / 2 5 3, 1 5 3
(32)優先日	平成11年2月19日(1999.2.19)
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	ウィッシュ・テクノロジー・ファウンデーション・インコーポレイテッド
	アメリカ合衆国53705ウィスコンシン州マディソン、ウォールナット・ストリート614、サーティーンス・フロア
(72)発明者	アラン・ダブリュー・シュヴァーバーカー
	アメリカ合衆国 53211-0413 ウィスconsin、ショウッド、ノース・ファーウエル アベニュー 4060
(74)代理人	弁理士 倉内 基弘 (外1名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 一次元の化学化合物アレイ及びそれらのアセイ方法

(57)【要約】

組合せライブラリーを糸のような一次元支持体上に固相合成する方法を提供する。その方法は、構造的な特徴を糸に沿った周期的な順列を、異なる構造的な特徴が糸に沿って特徴的な固定頻度で繰り返されるように含む。糸を、ライブラリー中の化合物の活性に比例した信号を発生するように処理し、次いで糸を、適当な検出装置を通して引っ張ることによってアセイする。生成した時間ドメイン信号をフーリエ変換によって処理する。処理された信号の周波数ドメイン中のスパイクは、活性に寄与する構造的な特徴が糸上に作り出された頻度を示す。

**【特許請求の範囲】**

**【請求項1】** 支持体に結合された化学化合物のアレイであって、各々の化学化合物が支持体のあらかじめ決められた部分に結合されたアレイ。

**【請求項2】** 下記の工程：

反応性官能価を有する支持体を供し；

該支持体を一連の試薬又は反応条件に暴露し、該反応試薬又は反応条件の各々は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ一連における各々の個々の反応試薬又は反応条件は、特有の距離又は時間の関数として識別され；及び

該支持体を1つ又はそれ以上の更なる一連の試薬又は反応条件に、所望する化合物のアレイが得られるまで暴露し、該試薬又は反応条件の各々は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ該1つ又はそれ以上の連における各々の個々の試薬又は反応条件は、特有の距離又は時間の関数として識別される

を含む方法によって調製される請求項1のアレイ。

**【請求項3】** 下記の工程：

- a) 反応性官能基を有する支持体を供し、
  - b) 支持体を幾何学的テンプレートの回りに巻き取り、
  - c) テンプレートの表面を縦方向に分割して領域にし、
  - d) 各々の領域を1つ又はそれ以上の試薬又は反応条件に暴露し、それにより反応性部分を結合し又は官能基を改質するようにし；及び
  - e) 工程(b)～(d)を、所望するライブラリーが得られるまで繰り返す
- を含む方法によって調製される請求項1のアレイ。

**【請求項4】** 反応性部分が保護基によってマスクされた更なる官能基を有し、かつこれらの保護基を取り去った後に、1つ又はそれ以上の試薬又は反応条件で処理する請求項3のアレイ。

**【請求項5】** 前記アレイにおける各々の化合物のアイデンティティーが支持体上のその位置によって特有に特定される請求項1のアレイ。

**【請求項6】** 前記化合物の各々が、1つ又はそれ以上の反応試薬から合成され、かつ該1つ又はそれ以上の試薬が特定の反復頻度で加えられ、支持体の特定の位置で確定される請求項1のアレイ。

【請求項7】 一次元である請求項1のアレイ。

【請求項8】 下記の工程：

反応性官能価を有する支持体を供し；

該支持体を一連の試薬又は反応条件に暴露し、該反応試薬又は反応条件の各々は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ一連における各々の個々の試薬又は反応条件は、特有の距離又は時間の関数として識別され；及び

該支持体を1つ又はそれ以上の更なる一連の試薬又は反応条件に、所望する化合物のアレイが得られるまで暴露し、該試薬又は反応条件の各々は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ該1つ又はそれ以上の一連における各々の試薬又は反応条件は、特有の距離又は時間の関数として識別される

を含む化合物のアレイを調製する方法。

【請求項9】 前記糸が、单一物質からなる支持体を含む請求項8の方法。

【請求項10】 前記支持体が单一の表面変性された物質を含む請求項9の方法。

【請求項11】 前記支持体が複合支持体を含む請求項8の方法。

【請求項12】 前記支持体が、連続した構造支持体上にアレイされた不連続の合成された支持体を含む請求項8の方法。

【請求項13】 支持体を供する工程の後に、更に下記：

支持体を幾何学的テンプレートの回りに巻き付け；及び

幾何学的テンプレートの表面を分割して平行な領域にする

ことを含む請求項8の方法。

【請求項14】 前記支持体が、シリンダー、多角形断面の角柱、領域を区別するための隆起を有するシリンダー、平板及び円錐セクションからなる群より選ぶ幾何学的テンプレートを含む請求項13の方法。

【請求項15】 化合物の線形アレイが、化合物の線形シーケンスの隣接部分を含む化合物のアレイを含みかつ最適に多様なサブセットを表わす請求項8の方法。

【請求項16】 化合物の線形アレイが、各々のライブラリーメンバーの單一コピーを生成するのに必要であるよりも長い支持体から合成する化合物のアレ

イを含み、かつこれより一連の複製を供して再現性を評価する請求項8の方法。

【請求項17】 化合物の線形アレイを供する工程が、各々の可能な組合せを一度表わす化合物のアレイを供することを含む請求項8の方法。

【請求項18】 下記の工程：

- a) 反応性官能基を有する支持体を供し、
- b) 支持体を幾何学的テンプレートの回りに巻き付け、
- c) テンプレートの表面を縦方向に分割して領域にし、
- d) 各々の領域を1つ又はそれ以上の反応試薬又は反応条件に暴露し、それにより反応性部分を結合し又は官能基を改質するようにし；及び
- e) 工程(b)～(d)を、所望するライブラリーが得られるまで繰り返すを含む化学アレイを調製する方法。

【請求項19】 反応性部分が保護基によってマスクされた更なる官能基を有し、かつこれらの保護基を取り去った後に、1つ又はそれ以上の試薬又は反応条件で処理する請求項18の方法。

【請求項20】 前記支持体が、シリンダー、八角形、六角形、長方形、及び領域を区別するための隆起を有するシリンダーからなる群より選ぶ幾何学的テンプレートを含む請求項18の方法。

【請求項21】 化合物の線形アレイが、化合物の線形シーケンスの隣接部分を含む化合物のアレイを含みかつ最適に多様性のサブセットを表わす請求項18の方法。

【請求項22】 化合物の線形アレイが、各々のライブラリーメンバーの單一コピーを生成するのに必要であるよりも長い支持体から合成する化合物のアレイを含み、かつこれより一連の複製を供して再現性を評価する請求項18の方法。

【請求項23】 化合物の線形アレイを供する工程が、各々の可能な組合せを一度表わす化合物のアレイを供することを含む請求項18の方法。

【請求項24】 下記の工程：

化学化合物の線形アレイを供し、それにより化合物の各々のアイデンティティーがアレイの開始に関する距離又は時間の関数になるようにし；

アレイ中の化合物をアセイして特定の所望する活性を有するそれらの化合物を検出し；及び

該化学化合物の線形アレイを、特定の所望する活性を有する化合物を検出することができる適した検出装置を通して一定の速度で輸送するを含むアレイ中の化学化合物の各々の性質を測定する方法。

【請求項25】 化合物の各々を支持体に結合させる請求項24の方法。

【請求項26】 化合物の各々を支持体に結合させながらアセイする請求項25の方法。

【請求項27】 化合物の各々を、アセイする工程の前に、支持体から開裂する請求項24の方法。

【請求項28】 化合物の線形アレイが、化合物の線形シーケンスの隣接部分を含む化合物のアレイを含みかつ最適に多様性のサブセットを表わす請求項24の方法。

【請求項29】 化合物の線形アレイが、各々のライプラリーメンバーの單一コピーを生成するのに必要であるよりも長い支持体から合成する化合物のアレイを含み、かつこれより一連の複製を供して再現性を評価する請求項24の方法。

【請求項30】 化合物の線形アレイを供する工程が、各々の可能な組合せを一度表わす化合物のアレイを含む請求項24の方法。

【請求項31】 下記：

化合物のアレイを線形光学ファイバー上に調製し；  
溶解している該化合物の該アレイを蛍光性種に接触させ；  
該蛍光性種を、光源を提供することによって励起させ；及び  
蛍光性種に結合することができる特定のライプラリーメンバーを検出することを含む蛍光性種に結合させる化学化合物をアセイする方法。

【請求項32】 前記蛍光性種を励起させかつ特定のライプラリーメンバーを検出する工程が、同時に光源を提供しつつ前記支持体を装置を通して一定の速度で移動させることができる装置を含み、それにより結合することができる特定の化合物が生じる距離又は時間を識別し、それにより特定の化合物のアイデンテ

イティーを識別するようにする請求項31の方法。

【請求項33】 下記の工程：

化合物の線形アレイを供し、

ライブラリー中の各々の化合物の活性を測定し、それにより各々の化合物についてのデータポイントを得るようにし、

線形アレイ中のデータポイントを、ライブラリー中の可変構造特徴をアレイ中で固定間隔で繰り返すように配列し、及び

生成したデータポイントの線形アレイをフーリエ変換によって数学的に処理する

を含むライブラリー中の化合物から構造－活性関係を得る方法。

【請求項34】 化合物の線形アレイを供する工程が、化合物の線形シーケンスの隣接部分を含む化合物のアレイを提供することを含みかつ最適に多様性のサブセットを表わす請求項33の方法。

【請求項35】 化合物の線形アレイを供する工程が、各々のライブラリーメンバーの單一コピーを生成するのに必要であるよりも長い支持体から合成する化合物のアレイを提供すること含み、かつこれより一連の複製を供して再現性を評価する請求項33の方法。

【請求項36】 化合物の線形アレイを供する工程が、各々の可能な組合せを一度表わす化合物のアレイを供することを含む請求項33の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## (発明の背景)

組合せライブラリーは、薬剤、触媒及びその他の物質のような有用な化合物を見出すような実用的な目的のために、並びにその他の科学的な疑問に答えるための両方で、所望の性質を有する化合物を識別するための重要な道具となってきた（Geysan等、Molec. Immunol. 1986, 23, 709～715；Houghton等、Nature, 1991, 354, 84～86；Frank, R., Tetrahedron, 1992, 48, 9217～9232；Bunin等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 4708～4712；Thompson等、Chem. Rev. 1996, 96, 555～600；Keating等、Chem. Rev. 1997, 97, 449～472；Gennari等、Liebigs Ann. / Recueil, 1997, 637～647；Reddington等、Science 1998, 280, 1735～1737）。組み換え化学の分野は、多数の種の内の任意のものを各々の工程で多数の中間体に結合させる反応によって生成される化学化合物のライブラリーを調製し、それらの組合せによってずっと多い数の生成物を生じることを包含するのが普通である。そのような組み換え合成アプローチは、医薬品リード化合物識別及び開発、並びに検出器及び触媒開発を含む種々の仕事にとって重要であると広く認識されている（例えば、Lam, K. S. ; Lebl, M. ; Krchnak, V. Chem. Rev. 1997, 97, 411～448；Nefzi等、Chem. Rev. 1997, 97, 449～472；Gennari等、Liebigs Ann. / Recueil, 1997, 637～647；Gravert等、Chem. Rev. 1997, 97, 489～509；Thompson等、Chem. Rev. 1996, 96, 555～600；Accounts Chem. Res. 1996, 29 (Special Issue on Combinatorial Chemistry) ; Pirrung等、Chem. Rev. 1997, 97, 473～488；Czamik, A. W., Curr. Opin. Chem. Bio.

1., 1997, 1, 60を参照)。

#### 【0002】

組合せ合成から生じる多数の化合物から関心のある物質を識別するために2つの一般的なアプローチが用いられてきた: デコンポルーション(例えば、Gey san等、Molec. Immunol. 1986, 23, 709~715; Houghton等、Nature, 1991, 354, 84~86を参照)及びコード化(例えば、Czamik, A. W. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997, 94, 12738~12739を参照)。デコンポルーションアプローチでは、多数の化合物が調製され、それで化合物はプールにグループ化され、それらの活性が求められる。最も高い活性を有するプールが、構成成分を更に分割するように再合成され、これらの一層小さなプールは繰り返しテストされ、個々の化合物が識別されるまで更に分割される。

#### 【0003】

コード化アプローチは、ライブラリー中の各々の化合物に識別子をコード又は標識の形態で会合し、次いで化合物の全ライブラリーをスクリーンすることを伴う。望ましい性質を有するそれらのメンバーが選定された後に、識別子を用いてヒットのアイデンティティーが求められる。識別子は、ライブラリー中の化合物の空間位置(例えば、ミクロリットル板中の特定のウェル)でも、又は化合物に物理的に又は空間的に会合された容易に識別可能な化学的又はその他の標識でもよい。

#### 【0004】

これらのアプローチの各々は、多くの変形を有し、各々は、利点又は不利を有し；好適な選定は、用途に依存する。デコンポルーションアプローチは、実験的に簡単であり、溶液における活性についてのアセイを用いて実施され、誘導されたプールされたデータの解析を可能にし、有用な構造－活性普遍化に至ることができる。デコンポルーションの不利は、反復合成を必要とし、混合物の分析に付随する複雑(作用物質及び拮抗物質が存在する時のような)、及び最も有意には、非常に高い活性種及び多くの低い平均的活性種を含有するプールを、多くの適度の活性のメンバーを含有するプールと区別することができない時のように、情

報の損失を含む。この問題を正当と認める、個々に結合を減少させるが、組み合わさせて結合を増進させる置換基の例が知られている（例えば、Liang等、*Science* 1996, 274, 1520を参照）。

#### 【0005】

コード化アプローチは、個々の種をテストし、それでそれは正確であるという利点を有する。その上に、コード化アプローチは、ロボット的分離合成を受けることが可能で、活性についての可能なアセイにおける大きな融通性に至ることができるのがしばしばである。他方、そのようなロボット合成は、相当の初期投資を要し、かつ調べることができる化合物の数は限られる。非常に多い数の化合物の分析を受けることが可能ないいくつかの重要なコード化スキームが開発されてきた。化学的標識付け（例えば、Brenner等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 5381~5383; Ohlmeyer等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 10922~10926；米国特許第5, 565, 324号を参照）は、「最良の」化合物を見出すために非常に有効であるが、全ライブラリー翻訳は実行できず、それでライブラリー情報の多くが失われる。全ライブラリー分析は、空間的にコード化されるライブラリーによって可能であり、それらの中で写真平版的「VLSIPS」アプローチは、非常に高い情報密度を提供する（例えば、Fodor等、*Science* 1991, 251, 767~773；米国特許第5, 143, 854号；米国特許第5, 547, 839号を参照）が、複雑な装置を要しかつ他の手段に比べて相当に精巧であり；合成の部分的に逐次の性質は、オリゴヌクレオチドのアレイの合成のように、そのような系を各々の段階においてできるだけ小さい数の試薬を伴う用途に最も良く適応させる。（例えば、*Array of oligonucleotides on a solid substrate*、米国特許第5, 445, 934号及び同第5, 510, 270号；*Synthesis and screening of immobilized oligonucleotide array*、米国特許第5, 510, 270号；*Printing molecular library arrays using deprotection agents solely i*

n the vapor phase、米国特許第5, 599, 695号を参照)。その他のコード化系は、スポット合成変性 (Frank, R., Tetrahedron, 1992, 48, 9217~9232) を含み、これは、簡単であるが、平行よりもむしろ固有に連続性であり、非常に労働集約的であり、かつ低い情報密度を有する。

#### 【0006】

化学的標識付けアプローチの簡単さは、一部スプリット／ミックス合成技術 (Furka等、Int. J. Pept. Prot. Res. 1991, 37, 487~493を参照) により、該技術では、固相合成が、各々の反応が支持体のサブセット上で成し遂げられた後に、粒子が次の工程のために再混合されかつ更に分割されるように実施される。これは、試薬の混合物で実施される合成について見出されるのに比べて、反応性レートへの依存性が小さい比を生じ、かつ固体支持体の各々の粒子は、单一の合成ヒストリーを有し、そのため特定の粒子における活性は、特定の化合物の活性を意味するようになる。その上に、固体支持体の小さな粒子、又はビーズは、通常のガラス器具中で懸濁体として取り扱わることができ、合成手順を良く知られている有機合成技術に一層近く近づけることができる。一部この理由で、そのようなビーズ上で、その他のタイプの支持体に比べて、固体支持体上での一層大きな範囲の化学反応が実施してきた。(例えば、Process for the simultaneous synthesis of several oligonucleotides on the solid phase、米国特許第4, 689, 405号を参照)

#### 【0007】

組合せ合成をスプリット／ミックスアプローチの簡単さと合併させ、全ライブラリー翻訳を簡単な方法で可能にし、かつ複雑な装置を用いないでアセイを受けることが可能なコード化技術についての要求が依然ある。本発明は、この理想に近づける。それは、スプリット／ミックス合成の簡単さを空間アレイの全ライブラリー翻訳と合併させる。それは、定量的構造／活性関係 (Q S A R) を発展させるためにライブラリーから誘導可能な情報を処理する特に直接的な方法を有意の態様として提供する。

**【0008】****(発明の開示)**

本発明は、全規模平行合成を全規模データ分析と組み合わせることが望ましいことを認識し、これより化学化合物のアセイを調製する新規な方法及びそれらを分析する新規な方法を提供する。

**【0009】**

本発明の一態様では、化合物アレイは、官能基を有する系又は支持体を供し、該支持体を1つ又はそれ以上の連の反応条件に暴露することによって合成するもので、各々の連の反応条件又は試薬は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ特定の連における各々の個々の反応条件又は試薬は、特有の距離又は時間の関数として識別可能である。所定の好適な実施態様では、支持体は、単一物質を含む。その他の好適な実施態様では、支持体は、複合支持体を含む。なお他の好適な実施態様では、支持体は、連続した構造物質上にアレイされた不連続の合成された支持体を含む。これより、発明の方法に従えば、化合物の線形アレイであって、各々の化合物は、その距離又は時間の関数として特有に識別されるものが生じる。

**【0010】**

別の態様では、本発明は、アレイ中の化合物を分析する新規な方法を提供する。発明の方法に従えば、アレイ中の化合物を、特定の所望する活性を有するこれらの化合物を検出するためにアセイし、アレイの化合物を、次に特定の所望する活性を有する化合物を検出することができる適した検出装置を通して、好ましくは一定の速度で輸送するのが普通である。この線形配置のデータは、特有の方法で生じて得られたデータを分析する。上記した合成のモードのために、化合物の特定の断片のアイデンティティーは、用いる反応体又は条件について用いる期間によって決められる反復時間で循環する。これより、フーリエ変換による次のデータの数学的処理は、いずれの構造／活性関係も示す。

**【0011】****定義**

下記の用語は、それらの一般的かつ技術的に特定の定義に加えて、更に下記の

意味を含むことを意図する：

【0012】

「糸」：本明細書中で用いる通りの「糸」とは、化学ライブラリーを結合するための合成的に有用な部位を支持する実質的に一次元の支持体である。糸は、モノフィラメント、フィラメントの編組又は巻き取りアセンブリー、テープ、中空チューブ、等の物理的な形態をとつてよい。糸は、適当な物理的、化学的、及び機械的な性質を備えた任意の物質でよい。適した物質は、棉、ポリアミド、ポリエステル、アクリル系誘導体、テフロン、ガラス、スチール、KEVLAR、等にすることができるが、これらに限定しない。関連する性質の例は、引張強さ、弾性モジュラス、及び予想される化学的処理への不活性である。糸自体は、ライブラリーメンバーの結合を共有的に又はその他の方法で可能にするように化学的に改質してよく、或は糸は、例えば糸に沿ってアレイした連続のビーズ、グラフトポリマー層、又は糸に被覆した又は糸中に含浸させたゲル相のように、合成用の連続又は不連続固体相を支持してもよい。合成支持体として使用するための種々の物質及び表面を官能化する方法は、多数當分野で知られている。

【0013】

「領域」：本明細書中で用いる通りの「領域」とは、あらかじめ決めた化学試薬又は条件にあらかじめ決めた時間で暴露する糸のセグメントである。糸の所定の隣接部分は、複数の重なる領域に属することができる。

【0014】

「メンバ」：本明細書中で用いる通りの「メンバー」とは、一緒になって化学ライブラリーを形成する複数の化学化合物の内の一種である。各々のメンバーは、化学試薬であって、それらに糸の隣接部分を暴露したもののシーケンスの結果として、糸の隣接部分内で生成されることになる。

【0015】

「周期的平均化」：本明細書中で用いる通りの「周期的平均化」とは、同じ相対的大きさのすべてのメンバーにより、2回以上複製するライブラリーを利用するノイズ低減法である。各々のライブラリーメンバーからの信号は、そのメンバーの各々のその後の発生からの信号によって平均化される。このプロセスは、

また、下記に記載する有用な情報を抽出するために一層短い周期時間で用いてもよい。

#### 【0016】

「信号」：本明細書中で用いる通りの「信号」とは、各々のライブラリーメンバーの測定した性質である。信号の例は、蛍光、蛍光分極、ルミネセンス、放射線、放射線の吸収、起電電位、pH、酵素活性、細胞成長、等にすることができ、これらに限定しない。信号のアイデンティティーは、ある所望の性質であって、それについてライブラリーをアセイしているものに直接に又は逆に比例することができる。そのような性質の例は、金属、タンパク質、核酸、又は関心のある他の物質についての結合親和力、触媒活性、或は生物学的活性である。大概、任意の知られている固相アセイの方法を本発明に適応させることができる。所定の液相アセイも、適当な液体試薬を飽和させた糸を処理することにより、又は糸からライブラリーメンバーを移すことによって同様に適応させることができる。

#### 【0017】

##### (発明の詳細な説明)

本発明は、全規模平行合成の力を全規模データ分析と組み合わせることが望ましいことを認識して、線形に組織化された化合物アレイを合成するな方法及びそれらを分析する方法を提供する。一般に、ライブラリーアレイは、官能基を有する糸又は支持体を供し、該支持体を1つ又はそれ以上の連の試薬又は反応条件に暴露することによって合成するもので、各々の連の試薬又は反応条件は、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ特定の連における各々の試薬又は反応条件は、特有の距離又は時間の関数として識別可能である。これより、本発明の方法に従えば、化学ライブラリーの線形アレイであって、各々の化学化合物は、その距離又は時間の関数として特有に識別されるものが生じる。その上に、本発明の方法によって達成される線形化は、化学化合物をアセイする特有の方法及びアレイ中の化合物を分析する特有の方法を提供する。特に好適な実施態様では、これらの化合物を、構造／活性関係について分析する。

#### 【0018】

発明性のあるライブラリー及び方法のいくつかの例を下記に提示するが、これらは、本発明の範囲を制限することを意図しない。

### 【0019】

#### 化合物のライブラリーの調製

上に検討した通りに、本発明は、一態様では、線形様式で組織化された化学化合物のアレイ、及びこれらの線形に組織化されたアレイを造る方法を提供する。一般に、これらのアレイは、反応性基を有する支持体又は糸を供し、次に該支持体を一連の反応条件又は試薬に暴露することによって調製するもので、反応条件又は試薬の各々のは、支持体に沿って特定の期間で循環し、かつ連における各々の個々の反応条件試薬又は反応試薬は、特有の距離又は時間の関数として識別可能である。当業者ならば理解する通りに、一層入り組んだ化合物のライブラリーを生成するために、支持体を1つよりも多くの連の試薬又は反応条件に暴露するのが望ましくかつまた所定の連の試薬又は反応条件について可能な最大数の組合せ提供することも望ましい。これより、支持体を2つ以上の連の反応条件又は試薬に暴露するのが理想的である。好適な実施態様では、各々の次の連の反応条件を、他の連に関して支持体に沿って特定の期間で循環させる。所定の好適な実施態様では、それらの期間は、支持体又は糸を幾何学的テンプレートの回りに巻き付け、次いで幾何学的テンプレートの表面を分割して糸の方向を横切る領域にすることによって得る。その他の好適な実施態様では、それらの期間は、支持体又は糸に関して特定の距離又は時間を測定することによって得る。発明の方法に従えば、一つの好適な実施態様では、適した糸長さ及び期間を利用しさえすれば、すべての化合物の組合せは、等しく表わされる。代わりに、別の好適な実施態様では、ライブラリーを、特定の全ライブラリーについて必要であるよりも短い隣接する支持体を利用することによってサブセットを表わすようにデザインする。同様に、複製を有するライブラリーは、各々のライブラリーメンバーの單一コピーを生成するのに必要であるよりも長い固体支持体を利用することによってデザインすることができよう。

### 【0020】

当業者ならば理解する通りに、支持体又は糸は、所望する物理的、化学的、及

び機械的な性質を備えた任意の物質であって、それに化合物のアレイを合成する又は結合することができるものを含むことができる。関連する性質の具体的な例は、引張強さ、弾性モジュラス、及び予想される化学的処理への不活性であるが、これらに限定しない。いくつかの実施態様では、この支持体は、単に一種の物質を含む。その他の実施態様では、この支持体又は系は、複合材である、すなわち一種以上の物質の組合せを任意の可能な形態で含む。单一物質又は複合支持体に使用するため特に好適な物質の例は、棉、ポリアミド、ポリエステル、アクリル系誘導体、テフロン、ガラス、スチール、KEVLAR、金属、等、又は一種以上の適当な物質の任意の組合せを含み、これらに限定しない。

#### 【0021】

また当業者ならば理解する通りに、広い範囲の複合支持体を利用してよい。支持体の例は、別の物質用の合成固体支持体として働くことができる不活性物質のフィラメント又はテープを含み、これらに限定しない。この第二の物質は、確立された手順、例えば置換されたステレンの放射線グラフト重合によって造ることができよう（例えば、Berg, R. H. 等、J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8024~8026を参照）。別の可能な支持体は、構造支持体上に被覆した架橋されたゲル層を含む。この合成固体支持体物質の性質（架橋の存在及び密度、官能基の極性、安定性、アイデンティティ及び密度並びに分子を結合させるためのリンカー）は、所定の用途に適合させることができる。好適な性質は、確実に、合成及び開裂に適した反応条件に、及びライブラリーメンバーを、支持体に結合させながらアセイすべきか、又は支持体から開裂した後にアセイすべきかどうかに依存することになる。

#### 【0022】

別の特に好適な実施態様では、支持体が、連続した構造支持体上に沿って不連続の合成支持体物質を含むことを特徴とする不連続な支持体を含む。この支持体によって提供される有意の利点の内の一つは、合成する間固体支持体を更に分割して領域にすることが、試薬の一つのドメイン又は領域から別のドメイン又は領域への拡散を排除すれば、簡単にされるであろうということである。これは、終局的に、合成において不活性雰囲気並びに一層広範囲の反応条件及び試薬を使用

することを促進することになる。加えて、不連続な支持体の離散した領域は、分析及び合成する間はっきりと区別されかつ識別され、距離測定について要求される精度は低い。種々の目的でサンプルを取り出すこともまた簡単にされる、というのは、位置よりもむしろ対象が特定されるからである。不連続な支持体の例は、安定な糸に結合されたゲル支持体の小さなビーズを含み、これらに限定しない。

#### 【0023】

通常、一旦ライブラリー合成において使用するための支持体を選定したら、全般的に上記した通りに、いくつかの連の試薬を加えることにより、或は代わりに又は加えて支持体を特定の連の反応条件に暴露することによってライブラリーを形成する。各々の連の反応条件又は試薬のアイデンティティーを、その固定点からの距離によってコード化し、それで各々の変数は、固定した反復距離で循環し、こうして線形アレイにおける化合物についての情報を提供するようになる。

#### 【0024】

本発明の好適な実施態様を一層特に説明するために、一次元の糸支持体上に化合物のライブラリーを調製することを下記に説明する。この実施態様では、化合物のライブラリーを1次元の固体支持体、又は糸上に下記のようにして調製するのが普通である。糸を図1Aに示す通りにシリンダーの回りに单一の螺旋層で巻き付ける。当業者ならば理解する通りに、多角形断面の角柱（例えば、六角形テンプレート、八角形テンプレート、長方形テンプレート）、領域を区別するための隆起を有するシリンダー、平板、円錐セクション、等を含むが、これらに限定しないその他の幾何学的テンプレートもまた利用することができる。図1Bに例示する通りに、シリンダーの表面を縦方向に分割して複数の領域にした後に、複数の各々に異なる試薬を接触させる。領域は、不活性なバリヤー又はシーラントを使用することによって分離するのが好ましく、シーラントは、随意に光を発する又は吸収するように改質する。バリヤーは、不溶性エラストマー或はシリコン又はパラフィンワックスのようなワックス様物質であるのが好ましい。領域を分離又は確立するその他の技術は、バリヤー無しで試薬を適用すること、又はチャンネルであって、それらの間を液体試薬を通すことができるものを形成する固

体壁によって分割すること、又は粒子への暴露を限るためのマスキングを含む。これは、反復ドメインであって、それらの上に各々の種が結合されるものを提供し、これらをスキームにおいて文字又は色によって示す。各々の種のアイデンティティーは、これより糸の端からのその距離によってコード化され、それで結合させるべき各々の種は、固定した反復距離で循環するようになる。

#### 【0025】

領域に分割するホイールを使用して試薬を一次元の支持体上にプリントするような、この目標へのその他の物理的なアプローチは、発明の範囲内であることを意図する。各々の領域に結合させる試薬は、単一の種からなっても、又は種の混合物にしてその領域において部分の混合物を糸に結合させるようにしてもよい。

#### 【0026】

次いで、第二連の試薬を、糸を更に分割して領域にした後に糸に、好ましくは異なる反復頻度でかつ好ましくはすべての試薬組合せが等しく表わされるようにして糸に結合させる。これは、図2A～Dに示す通りに、糸を第一と異なる適した直径の第二シリンダーの回りに巻き付けた後に、領域に分割し、かつ第二連の試薬を接合させることによって行うことができる。試薬をホイールからプリントすることによって適用する実施態様では、これは、異なる直径のホイールからのプリンティングに相当する。

#### 【0027】

すべての所望する試薬を使用してしまうまでこの工程を繰り返すと、糸に結合されたライブラリーをもたらす。適したシリンダー比及び十分な線形固体支持体を使用しさえすれば、すべての組合せは等しく表わされることができる。各々の異なる化合物は、固体支持体に沿うその位置によって特に特定される。これは、すべての組合せが複製無しで表されることを確実にするために、一体式固体支持体を使用し、これを各々の多様性発生工程で更に分割するスキームに作業上類似している (Stankova等、Pept. Res. 1994, 7, 292; 米国特許第5, 688, 696号)。本発明における特徴は、更に分割することが、支持体を物理的に破片にせず、それで種のアイデンティティーに関する情報が空間的に保持されることである。本発明、これより、二次元の

空間的コード化よりもむしろ一次元のコード化で、V S L I P S法に似ている。

しかし、本発明の方法は、V S L I P S法と異なり、ライブラリーを合成又は分析するための費用のかかる装置を要しない。

#### 【0028】

発明の一つの特に好適な実施態様は、図3に示す通りに、接合している領域の間の分割をすべてのシリンダーについて糸上の同じ場所に置くことである。これは通常必要でないが、すべてのライブラリー成分が等しいサイズでありかつ糸に沿って均等に離間され、及び各々の組合せの一コピーはいずれかの反復前に現れるので、それは、プロセスのいくつかの態様を簡単にする。ライブラリー成分の間の任意のパリヤー領域は、各々のシリンダーについて重ねられ、それでこれらの領域における有用な固体支持体の損失は最少にされるようになる。この簡単さのコストは、すべての組合せを表わすつもりならば、使用することができる領域の数への制限になり、その数は、比較的に主要でなければならない。

#### 【0029】

例えば、各々のライブラリーメンバーが糸の長さLを占めるべきならば、糸を円周3Lのシリンダーに巻き付ける間に3つの試薬を糸に適用してよく、糸を円周5Lのシリンダーに巻き付ける間に5つの試薬を糸に適用してよく、糸を円周7Lのシリンダーに巻き付ける間に7つの試薬を糸に適用してよい。このプロセスの結果は、下記の通りの糸に支持されたライブラリーになる：

#### 【化1】

円周3Lシリンダー：abcabcbabcabcabcabcabcabcabcab...

円周5Lシリンダー：defghdefghdefghdefghdefghdefghdefg...

円周7Lシリンダー：ijklmnoijklmnoijklmnoijklmno...

上記に例証する通りに、糸上の第一化合物である「adi」は、105すべての可能な組合せが発生された後に、位置106まで反復されない。

#### 【0030】

当業者ならば理解する通りに、かつ図1A及び1Bが一般的に示す通りに、その他の方法もまた発明の系と適合し得る、すなわち領域のすべてを同じサイズ領

域に分割する必要がなく；むしろいくつかの領域は、他に比べて小さくしてよい。加えて、領域を同じ場所で分割する必要がなく、これより重なる領域を利用することができる。

### 【0031】

なお別の特に好適な実施態様では、上に一般的に記載した通りに、シリンドーのような幾何学的テンプレートの使用を利用しない；むしろ一連の反応試薬又は反応条件を特定の反復頻度で循環させかつ支持体に関するそれの距離又は時間によって識別する。ほんの一例では、固体状態物質の線形アレイの合成は、いくつか名前を挙げると、有用な輻射性 (E. Danielson等、Nature 1997, 389, 944~948)、磁性 (G. Briceño等、Science 1995, 270, 273~275)、触媒性 (S. M. Senkan等、Nature 1998, 394, 350~353)、又は伝導性によって調製することができる。これらのアセイは、蒸着によって又は可溶性のプリカーサー（前駆物質）から調製することができかつ各々の成分について異なる期間で周期的に変わる組成で造ることができよう。一層詳細には、試薬、或はその他の変数、例えばフィラメントの温度（蒸着について）又は反応体の濃度（可溶性のプリカーサーについて）のようなものを循環様式で変えることが可能である。

### 【0032】

#### 活性についてのライブラリーの評価

化学化合物のアレイを提供することにとっての利点の一つは、これらの化合物の特定の活性をテストする能力である。本発明では、化合物の線形アレイに、所望する活性を有する化合物を区別するために選定する特定のアセイを施すことができ、かつ所望の活性を有する化合物を、適した検出装置を使用することによって識別することができる。好適な実施態様では、線形アレイを所望の検出装置を通して移動させ、化合物のアイデンティティーをアレイ上のそれらの位置によって求める。当業者ならば、位置を、参考点からの距離を直接分析するか又は検出装置を通過する時間を分析する（この場合、時間を次いで距離に相関させる）か又は同様に距離に相関させることができる任意のその他のパラメーターを分析するかのいずれかによって求めることができると認めることを認めるものと思う。特に好適

な実施態様では、アレイを検出装置を一定の速度で通過させ、それで時間を距離に直線的に相関させるようとする。更に下記に検討する通りに、発明の系のこの新規な特徴は、特定のアセイを分析すること及び構造／活性関係を求めることが可能にする。

#### 【0033】

当業者ならば理解する通りに、活性についてのライブラリー成分のアセイは、種々の知られている方法で実施してよく、種々の活性、例えばいくつか名前を挙げると、結合活性、触媒活性、抑制剤活性及びプロモーター活性のようなものを検出することに關係してよい。その上に、所定のライブラリー成分のアセイもまた、化合物を依然支持体に結合させながら実施してもよく又は代わりに化合物を支持体から開裂した後に実施してもよい。

#### 【0034】

ほんの一例では、結合された検体の検出は、放出される輻射を測定することによって達成しても又は輻射吸光度を測定することによって達成してもよい。特定の検体、例えばレセプターに結合したそれらのライブラリーメンバーを識別するために、溶解しているレセプターの標識付けされた変形をライブラリーに結合に伝導性の条件下で接触させ、次いで標識を経て可視化してレセプターが糸上のどこに結合しあつ集まつたかを求めてよい。検体を結合する種を保持するこれらの部位を識別するための手順は、多数当業者に知られている (K r i c k a , L . , C l i n . C h e m . 1 9 9 4 , 4 0 , 3 4 7 ~ 3 5 7 ) 。本発明では、ライブラリーメンバーのアイデンティティーは、糸に沿つた位置として特にコード化される。特に好適な実施態様は、検体の検出を標識ライブラリーを輻射又は化学処理した後に放出される光を検出するような測光法によって行うものである。測光法は、標識の蛍光、燐光、又は化学ルミネッセンスによる発光を測定又は検出してもよい。測色法もまた採用してよく、例えば結合された検体についての E L I S A アセイを実施してよく、適した周波数における光の吸光度を、糸から反射、散乱される、又は糸を通過される光において検出してもよい。

#### 【0035】

糸に結合されたままの化合物のアセイは、逐次評価に限定する必要はない。別

の好適な実施態様は、糸をシリンダース又はその他の形態の回りに巻き付けながらイメージすることによって全平行アセイを必然的に伴うものである。一例は、それ自体シリンダー上に巻き付けられた、糸ライブラリーの回りに巻き付けられた写真フィルムの露光によって得られる化学ルミネッセント標識の結合の全平行評価になる。

### 【0036】

上述した通りに、本発明の方法によって調製した化合物もまた開裂して溶液中で分析することができる。これは、多くの手順によって、プールで、又は個々の識別される領域として実施することができる。線形固体支持体を切断して片にしたら、それを任意のその他の固体合成支持体のように、各々の領域上のライブラリーメンバーのアイデンティティーを知るという特徴をもって処理することができよう、それで所望ならば、情報を保持することができるようとする。本発明の方法及びアレイを溶液ベースのアセイにおいて使用する例は、また、ライブラリーメンバーの化学開裂を含むが、これらの化合物を貯蔵及び識別するためにこれらの合成固体支持体内に残す。これは、例えば、光、塩酸又はアンモニア蒸気を含み、これらに限定しない非抽出性試薬を使用することにより、或は安全つかみ(safety catch)脱保護を使用することによって達成することができる(例えば、Pank e等、Tet. Lett. 1998, 39, 17~18; R. Epton(編集)、Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and Combinatorial Libraries、407~410頁におけるHoffmann等、「New Safety Catch Linkages for the Direct Release of Peptide Amides into Aqueous Buffers」を参照)。この手順を適用した後に、糸ライブラリーをこの状態で貯蔵することができる。抽出用溶媒(例えば、pH 7水性緩衝剤)による次の湿潤は、合成支持体の領域に限られたライブラリーメンバーの溶液に至る。この状態において、拡散による汚染を防ぐために、ある領域と別の領域との接触を回避することが重要である。不連続領域を有する支持体か又は不透質バリヤーのいずれかは、糸に沿う化合物を分離する働

きをする。次いで、いくつかのアセイを適用することができる。

### 【0037】

特に好適な実施態様では、糸をアガロースゲルマトリックス中に埋めるか又は該マトリックスで被覆するならば、細胞ベースのアセイは、糸のどの領域が閑静な化合物をもたらすかを示すことができる (Salmon等、Mol. Div. 1996, 2, 57~63; Nestler等、Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 1327~1330を参照)。

### 【0038】

別の実施態様では、ライプラリーメンバーを、下記の例を含み、これらに限定しない溶液相アセイのために容器に移すことができる。一例では、湿潤された固体支持体と接触させることによって適当なマルチウエルにプリントすることを実施することができる。乾燥した開裂された糸をシリンダー上に接触を避けるために各々の領域の間に小さい間隔をおいて巻き付け、微細なミストで湿潤させ、必要ならばインキュベートし、次いで平たい又はマルチウエルの表面に転がすならば、各々のライプラリーメンバーのスポットが、各々既知の位置の別々のウエル内に形成されることになる。別の例では、糸を垂直のパルスド液体流を横切って移動させると、液体にライプラリーメンバーを抽出しつつ適当な容器に送出することを可能にする。パルスド流のアセイが、一組の化合物をトランスファーすることができ、次いで糸を進めて次の組を可能にし、化合物の列がある種のマルチウエル板に一度にトランスファーすることができるのはもちろんである。最後に、なお別の例では、糸又は支持体を切断して領域にし、各々を順繰りに適当な容器に入れることができる。

### 【0039】

発明の糸は、また、別の態様では、化合物の特定の活性を光学ファイバー支持体上でアセイする方法を提供する。特に、その糸は、化学的に変性した表面光学ファイバーを化合物の線形アレイを合成するための所望の支持体として利用する、詳細には、そのようなライプラリーは、溶液中の蛍光種に水洗いで取れないで結合することについて立証することができる、というのは、全内部反射によってファイバーの内部に限られる光による励起（光学ファイバーについての標準のモ

ード)は、溶液中の蛍光を励起させず、表面に極めて接近して結合される分子をエバネッセント波によって励起させることになるからである。光学ファイバーの表面変性は、標準のシラン化技術により、又はポリマー支持体で被覆することによって実施することができる。加えて、好適な実施態様では、光学ファイバー上のポリマー表面被覆は、ファイバーをモノマー中に浸漬しておきかつ光をファイバーに向けることによって造ることができる。光学ファイバー表面におけるエバネッセント波は、表面での重合を開始させ、モノマーのバルク重合を避けることができる。

#### 【0040】

上述した例は、本発明のいくつかの好適な実施態様を提示する意図であるが、発明の範囲は、これらの特別の例に制限されない。

#### 【0041】

##### 分析の方法

上に検討した通りに、発明の別の態様は、化合物の線形配置が、一連の化学化合物について提供されるデータを分析する方法を提供する。通常、この方法を利用すると、ライブラリー成分を評価するのにどんな信号を測定しようと、信号を次に糸距離又は特定の時間間隔の関数として数学的に処理する。個々のライブラリーメンバーから生じる、距離次元における個々の信号を、測定及び処理して各々の糸に結合されたライブラリー成分を評価し、その他の空間コード化方法と同等のデータをもたらすことができる。糸に沿った構造の周期的な変化は、特にデータ分析を受けることが可能である、しかし、これは、本発明のなお別の態様である。

#### 【0042】

当業者ならば理解する通りに、特別のシリンダーの円周による期間に相当する信号領域を平均化するならば、周期的に平均化された生成する信号は、プールが、糸をシリンダーの回りに巻き付けながら実施する反応をベースにするプリングスキームの信号と同等である。プリング戦略は、デコンポルーションスキームの成功にとり重要である；実際、G e y s e nは、最良を選定するために、すべての可能なプリング戦略によってライブラリーの複数調製を支持した。直接

検出装置からの各々の反復時間にわたる信号出力を平均化すると、すべてのプリング戦略によってプールされる合成と同じ情報を同じ形態で提供することになる。

#### 【0043】

これより、本発明の一態様は、データを分析するための新規なかつ強力な方法である。糸を適当な検出装置を通して移動させることによって、距離次元（糸に沿った位置）が時間ドメイン中にマップされる。本発明は、検出装置から直接か又は前処理の後にのいずれかに生成した信号をフーリエ変換することを提供する。時間ドメイン検出装置信号は、一様に離間された一連の測定値からなり、この場合に、すべての化合物が、それらが糸に沿って出現する順でアセイされる。分子の特定の断片のアイデンティティーは、合成のモードのために、分子のその部分を取り付けるのに反応について用いられる期間によって決められる反復時間で循環する。フーリエ変換した後に、頻度ドメインスパイクは、活性がその頻度で循環する何かに有意の度合いに依存することを示す。支持体を幾何学的テンプレートの回りに巻き付ける場合では、アセイする活性に最も重要な分子の特徴は、最も大きなスパイクにより、その特徴が生み出されている又は付けられていた間に糸が巻き付けられたシリンダーの円周に対応する頻度で示される。分子のその他の部分のライブラリーにおいて表わさられる変化の相対的な有意性は、信号の強さによりそれらの特徴的な頻度で示される。これより、頻度ピークの強さは、アセイされた性質が、対応するシリンダーを使用する反応において生み出され又は取り付けられる分子における変化に依存する程度を示す。

#### 【0044】

分子における所定の位置についての特定のグループのアイデンティティー及び相対的な適合性は、下記に記載する通りに、FTスペクトルから特徴的な周波数及びその調波で容易に摘出することができる。FTスペクトルは、有用な情報が由来し得るコンパクト表現、特にライブラリー変化を効果の線形組合せとして表わすことができる程度である。これより、全ライブラリーデータにおける傾向は、データ次元の数に関係なくライブラリーのFTスペクトルから直ちに明らかである。

## 【0045】

その上に、純化合物よりもむしろ化合物の混合物を任意の位置で使用することができる。次いで、この位置における変形の一般的な有意性を、変異型の間の相違は小さいが、求めることができる。例えば、ペプチド合成についてのアミノ酸を、疎水性、電荷、又は容積のようなアミノ酸の性質によってグループに集めることができ、ペプチドの所定の位置におけるその性質への有意性を求めることができる。

## 【0046】

全ライブラリーは翻訳されるので、2つ以上の場所における構造上の修正が総括的な官能価で相関されるかどうかを求めることが可能である。例えば、分子中の2つの位置におけるグループのペアリングは、結合決定因子になることができ、かつFT分析から明らかになる。例えば、3化合物シリンダー上に接合されたアミノ酸が低レベルの官能価を備えるならば、17化合物シリンダー上に接合されたアミノ酸もそうであるが、それらは一緒になって一層高いレベルの官能価を有し、FT分析は、51化合物の反復時間において信号を与えることになる。

## 【0047】

本発明のフーリエ変換法が、ライブラリーを一次元系上で調製及びアセイすることを要しないことは認められるものと思う。例えば、VLSIPSによって調製、又はマイクロリットル板中でアセイされたライブラリーを適当な方法によってアセイすることができ、生成したデータを、選定された構造上の特徴がシリーズ中に特徴的な頻度で再出現するするようにシリーズで配置することができる。次いで、データを時間シリーズのデータポイントとして処理し、上に教示した通りにフーリエ変換分析を施してよい。その上に、固体支持体を全く含む必要はない。複数の薬剤相互作用に関する実験を、細胞の希薄な懸濁液をチューブに通し、これに種々の連の薬剤を各々の薬剤について異なる循環時間と有する循環方式で加え、気泡によって分離することによって実施することができた。

## 【0048】

本明細書中に記載する1-D組織の利点は、頻度における可変性の複数の次元の表現の力及び多様性から生じる。当業者ならば、関係のある有用な原理もまた

一層高い次元性の数 (dimensionality) のデータアレイに適用することができることを認めるものと思う。たった1つの例を挙げるために、ライブラリーの活性をいくつかのアセイによって測定するならば、2-Dアレイであって、次元の内の一方が構造上の変化に対応し、他方が活性のタイプに対応するものを有することができる。選択性並びに活性を反映しあつ生成した1-Dアレイを処理することになるアセイ出力すべての関数を「信号」と定義することができる。一層融通性のあるアプローチは、2-D FTを使用し、次いで所望の選択性に対応する信号を使用してデコンボルートすることである。当業者ならば、同様に本発明のアプローチの範囲内に入るその他の変形を認識するものと思う

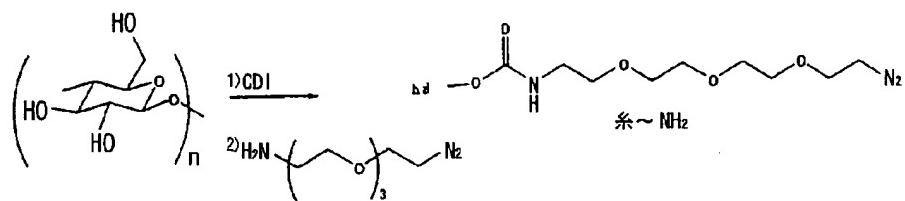
#### 【0049】

これらのアプローチは、メンバーの数が変更すべきパラメーターによって可能な組合せの全数に比べて小さい希薄なライブラリーのデザイン及び調製にも適用可能である。可能な組合せのどれかを選定して調製する時に、すべての可能な組合せの表現を変異型のシーケンスであって、各々の構造上又は手続き的変化がシーケンスに沿って特徴的な頻度で循環するものと考慮するのが有利である。調製するために選定するサブセットは、可能な組合せのこの表現の隣接した領域とすべきである。これは、ライブラリーのFT分析を、実際の合成又はコード化戦略に関係なく、すべての可能な組合せを評価されしないで、示す。それは、また、最適に多様な連の変異型も提供する (Freier等、J. Med. Chem. 1995, 38, 344~352; Konigs等、J. Med. Chem. 1996, 39, 2710~2719)。多数のパラメーターを変えるならば、このスキームは、すべてのメンバーのすべてのペアをなす組合せがサブセットで表現されることを規定する。

#### 【0050】

ライブラリー調製及び分析の説明

#### 【化2】



## 【0051】

棉糸は、ペプチド合成用の安価で、簡便でかつ適当な固体支持体である。下記に挙げる例では、棉糸をカルボニルジイミダゾールで処理し、中間体のアシリミダゾリドの発生を反射率IRで確認し、官能化された糸に1, 11-ジアミノ-3, 6, 9-トリオキサウンデカンとの反応を施した。生成した糸は、アミン基を末端基とするウレタン結合されたオリゴエチレングリコールを有し、これを本明細書中糸～NH<sub>2</sub>と略書きする。アミン基の密度5×10<sup>-8</sup>モル/cmは、ニンヒドリンアセイ (Stewart J. M.; Young, Solid Phase Peptide Synthesis; Pierce Chemical Co., 1984) によって求めた。ペプチド接合を、FMOOC保護されたHOBtエステルをNMP中0.3Mで使用して、セルロース支持体上でペプチド合成について前に特定した条件下で実施した (Frank, R., Tetrahedron, 1992, 48, 9217~9232)。アシリ化を接合の間プロムフェノールブルー法 (Krchnak等、Collect. Czech. Chem. Commun. 1988. 53, 2542) によってモニターし、選定した場合でニンヒドリンアセイによって定量した。（ニンヒドリンモニタリングは、破壊的な方法であるので、適当な反応条件を発達させる時に用いたが、ライブラリー合成の間は用いなかった。）各々の接合の後、脱保護の前に無水酢酸エンドキャップする、FMOOC-Alaを糸～NH<sub>2</sub>に逐次30分接合すると、逐次收率50%、70%、100%、100%をもたらした。これより、糸～NH<sub>2</sub>のアミノ基のいくつかは、他のものに比べて、接近しにくいことが明らかである。従って、3つのアラニンは、糸にライブラリー合成の前に接合されて、これらの反応性の低い基が糸全体にわたって同じようにして末端になるのを確実にし

た。

### 【0052】

超高分子ポリエチレン (UHMW PE) のシリンダーを長さ約 30 cm、かつ円周 3、5、7、11、13、17、19、23、及び 29 cm を有するよう精確な直径で機械で作った。電子同調コイルを巻き取るために使用するのに似ているワインド機を使用して糸をこれらのシリンダーの回りに单一層で極めて均等に巻き付けた。シリンダーに沿って縦に分割して、異なるアミノ酸を接合させるべき領域にすることを、下記の通りに実施した：修正ホットメルトグルーガンを使用してパラフィンワックスバリヤーを糸のシリンダーに沿って縦に 1 cm 毎に引いた平行線で適用した。ブラッククレヨンをこのワックスとして使用するならば、ライブラリーを読む際のセクションに下記に記載する理由で、それは特に有利である。ワックスを十分な量で適用して、ペプチドカップリング試薬の表面にじみが結合の時間にわたって起きないようにした。NMP、HOB T、D I C、及び FMOC の 0.3 M 溶液を 30 分間反応させて活性化されたエステルを形成し、次いで、各々のアミノ酸をワックス線の間のそれ自体の間隔に保つように注意して、ピペットで糸に適用した。糸の領域によって吸収される活性化されたアミノ酸の量は、紙固体支持体で観測された通りに、この濃度で、ペプチドをアシル化するのに十分なものである。測色アセイが、接合の均等性及び完全性の定性的な評価を可能にする場合がいくつかある。接合反応の経過にわたり、糸上に吸収されたプロムフェノールブルーは、アミン基が消費されるにつれて、青色から黄色に変化する。青色のままの領域を吸い取ってアシル化溶液を除き、現場再接合させた。接合した後に、すべての領域を吸い取りかつシリンダーから取り去ってエンドキャップし、すぎ、ピロリジンで脱保護し、すぎ、プロムフェノールブルー処理し、次のシリンダーの回りに巻き付けて更に反応させた。合成の終わりに、側鎖脱保護を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中の TFA で実施した。必要とした最も激しい条件は、室温で TFA 50%、2 時間であった。これらの条件下で、セルロースが一部分解され、ペプチドの 50% が糸から失われる (ニンヒドリンアセイ)。簡単な Boc 除去について、TFA 20%、20 分間が十分なものであり、物資の損失をほとんど引き起こさない。

## 【0053】

所望のペプチドを調製した後に、ライプラリーのアセイイング及び分析を行った。初めに、フルオレセイン結合されたストレプタビジンを糸ライプラリーと共にインキュベートし、ストレプタビジンに結合したそれらのライプラリー成分は、蛍光標識されるになった。一般にイムノアセイに適用されるのと同様のブロッキング及びインキュベーション手順を用いた。

## 【0054】

糸を保持するために側面を向き合わせたホイールを、PTFEチューブと共に通常のオーディオカセットケース中に設置してテープに代えて糸を向けた。これは、簡便な実施態様であるが、スプールサイズは、オーディオカセットにはまり込むように制限する必要はない。レコード／プレイヘッドを除いた通常のオーディオプレイヤーは、糸を一定の速度で引っ張る作用をし、糸巻き路をPTFEチューブの配置によって求めた。これらのチューブは、カセットをセルに接続し、セルは、標準の蛍光分光計にはまり込むように作った。

## 【0055】

糸を糸に焦点を合わせた単色の光のビームを通して一定の速度で引っ張り、分散された光をフィルターし、次いで光電子増倍管（PMT）によって検出した。PMT信号をコンピューターに供給し、信号の時間経過を記録した。時間は、糸の速度が一定であることから、糸に沿った距離に相当する。

## 【0056】

標準の蛍光セルのサイズ及び形状のアルミニウムブロックを調製した。テフロンチューブが、糸を下方にブロックのコーナーに、かつ上方に中央で光ビームを通して向けた。レンズが、励起ビームを糸上の小さなスポット(<1mm)中に焦点を合わせた。ここに例証する実施態様では、発光を拾い上げるレンズを分光計に作りつけたが、標準の蛍光分光計に使用するために、第二のレンズをセル内に設置して発光を平行にしてもよい。

## 【0057】

簡単な分光計をアルミニウムセル保持ブロックで作って、レンズ、フィルター、及びPMT用の窓を付けた。石英ハロゲン光源を平行にし、干渉フィルター（

「励起フィルター」)を通してフィルターし、ブロック及びセル内のレンズで糸に焦点を合わせた(焦点調整は、ランプの外部マイクロメーター調整によつた)。集光レンズは、発光を拾い上げ、それをPMT(PTI, Inc.からのスタンダードアローンユニット)の前に装着した第二の干渉フィルター(「励起フィルター」)を通してフィルターした。アナログ電圧出力を、A/Dボードを通してコンピューターに流し、簡単なBASICプログラムを使用して記録した。

#### 【0058】

糸の読みから得られたデータを、データを任意の時間単位でプロットした単一の離散した点として使用してグラフ上にプロットした。このプロットは、全ライブラリーの総括的信号を示した。規則的なピーク、並びに規則的な間隔でのくぼみが存在した。これらのくぼみは、ブラックワックスを適用した領域を表わす。この実施態様について、小さな残留蛍光を有する糸を使用してこれらの分割領域に信号を送った。ブラックワックスのストリップが間隔1cm毎に存在したので、単にライブラリーの始めからピーク数をカウントして特定のピークがどの化合物を表わすかを見出すことが可能であった。

#### 【0059】

いずれの側でも平均のくぼみよりも上の平均ピーク高さを取ることによって均等に離間されたピークを得た。データ中の各々のピークは、別の化合物を表わし、ライブラリーの絶対の始まりは分かっているので、各々のピークのアイデンティティーは、ライブラリーの終わりからの距離を測定することによって簡単に求められた。

#### 【0060】

この特定のライブラリーは、35の化合物の後に繰り返すことが知られていたので、適当な反復にわたる周期的な平均化(ピーク1は、36、71、等...で平均化される)を用いてノイズを低減させかつ各々のピーク高さについて一層信頼し得る値をもたらした。ピーク高さ対糸に沿う距離の生成したプロットを図7に表わす。

#### 【0061】

図7中のピークは、左から右に、下記の系列をこの順で表わす:

## 【化3】

A1, B2, C3, D4, E5, A6, B7, 等...

ここで:

X1	X2
A=His	1=Ac Leu
B=Ser	2=Ac Phe
C=Asp	3=Bz
D=Ala	4=Ac
E=Phe	5=Ac His
	6=Ac Glu
	7=Ac Gly

## 【0062】

このライブラリーにおいて、予期される最も高いピークは、最後のアミノ酸位に His を表わすもの ( $X_2 - \text{His} - \text{Pro} - \text{Gln} - \text{Phe} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}$ -系) である。エンドキャッピング種は、一層小さい相違を生じるはずである (Devlin等、Science 1990, 249, 404~406; Lam等、Nature 1991, 354, 82~82; Schmidt等、J. Mol. Biol. 1996, 255, 753~766)。これらの予期される結果の両方が見られる。所定の位置におけるグループ適合についてのプロファイルを、所定のシリンダーに対応する適当な一層短かい周期時間にわたる周期的な平均化によって得てもよい。

## 【0063】

糸の読みから得られたデータを、上に概略した通りに、化合物当たり 2 点に減らした (各々の信号についての 1 点は、信号のいずれの側での谷よりも高い平均の増加として取り、かつ 1 点は、各々のピークの間で取る)。標準のアルゴリズムを用いた基本のプログラムを使用してフーリエ変換を行った (Lynn等、Introductory Digital Signal Processing with Computer Applications; Wiley: Chichester, 1989.; Press等、Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing; 第2版; Cambridge Univ. Pr.: Cambridge

ge, 1993. ; Blahut. R. E. Fast Algorithms for Digital Signal Processing 1985. ; <http://theory.lcs.mit.edu/~fftw/>; [http://www.speech.cs.cmu.edu/comp.speech/Section\\_2/Q2.4.html](http://www.speech.cs.cmu.edu/comp.speech/Section_2/Q2.4.html))。好適な実施態様では、FTは、共鳴すべきであり：基数2アルゴリズムは、それ程適しておらず、データのオーバーサンプリングを要するであろう。所定のシリンダー上に設置した特定のアミノ酸の効能に対応する「波形」を下記の通りに抽出した。相対的な周波数におけるピークの実及び虚部を、すべての調波のように、周波数ドメインから抽出した。これらの値を、次いで一層小さなアレイの中に入れ、フーリエ変換して時間ドメインに戻した。生成した「波形」は、そのシリンダー上に加えた官能基の各々について出力信号を表わす。図7に示す35化合物ライブラリーの信号をフーリエ変換し、5及び7cmシリンダーに対応する波形をFTスペクトルから抽出した。これらの波形結合プロファイルを図8に示す。

#### 【0064】

##### 実験詳細

###### アミノ官能化された綿糸の調製：

一次元の綿支持体を、10% (v/v) HOAc/H<sub>2</sub>Oで15回すすぎ、各々のすすぎは、容積50mlにより室温でおよそ30秒であった。このサンプルを、次いで蒸留水で15回、10% NaHCO<sub>3</sub>で10回、蒸留水で10回、EtOHで10回、次いでCH<sub>3</sub>CNで15回洗浄した。次いで、糸をCaH<sub>2</sub>上CH<sub>3</sub>CNでN<sub>2</sub>下でソックスレー抽出によって乾燥させた。糸を、室温のCH<sub>3</sub>CN 250ml中CDI 10.14gの溶液50ml中にN<sub>2</sub>下で24時間振盪しながら入れた。溶液を、約1670 cm<sup>-1</sup>におけるカルボニルピークについてIRによって調べた。ピークが消失した時に、CDIを一層加えた。一旦ピークの高さが変化することを止めたら、反応は完了に至っていた。次いで、糸をCH<sub>3</sub>CNで10回すすいだ。糸を室温の純テトラエチレングリコールジアミンにN<sub>2</sub>下で24時間入れた。次いで、糸を10% HOAc/H<sub>2</sub>Oで10回、蒸留水で15回、飽和NaHCO<sub>3</sub>で10回、蒸留水で12回、EtOHで10回、及び

$\text{CH}_3\text{CN}$ で15回すすいだ。ニンヒドリンアセイは、アミン濃度 $1.92 \times 10^{-7}$ モル/ $\text{cm}^2$ を生じた。

### 【0065】

ライプラリー調製：

35ペプチドの小さなアセイを $X_2 - X_1 - \text{Pro} - \text{Gln} - \text{Phe} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}$ ～系として調製した。フラスコ中で糸全体にカップリングすることによって $\text{H} - \text{Pro} - \text{Gln} - \text{Phe} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala} - \text{Ala}$ ～系を調製した；ライプラリー変形を構成する $X_1$ 及び $X_2$ アミノ酸だけを、糸をシリンダーの回りに巻き付けながら、加えた。糸を円周5cmシリンダーの回りに巻き付けて、(FMOC) His、Ser、Asp、Ala、Phe(それぞれA-Eと表わす)から選ぶ $X_1$ を接合させた。エンドキャップし、脱保護し、7cmシリンダーの回りに巻き付けた後に、Leu、Boc-Phe、Bz、Ac、His、Glu、Gly(それぞれ1-7と表わす)から選ぶ $X_2$ を加えた。Boc-Pheは、遊離のアミン末端を生じ、他方FMOC誘導体として接合された他のアミノ酸をNアセチル化した後に、結合研究する。Fmoc脱保護及びアセチル化した後に、側鎖を50%TFA/DCM中で2時間脱保護した。ライプラリーを十分にすぎ、3%牛血清アルブミンでインキュベートすることによってロックし、ストレプタビジン-フルオレセイン接合体に暴露した。糸を乾燥させ、次いで糸読み機で読んだ。

### 【0066】

カップリング、エンドキャッピング、及び脱保護：

カップリング：上記した通りにして調製した糸-アミン3mをNMPで4回すすぎ、各々の回に7mlであった。NMP中1MのFmoc-アミノ酸0.5mlをHOBT/NMP溶液0.5ml及び1.2MのDCC/NMP溶液5mlと混合することによって、Fmoc-アミノ酸エステルを調製した。この溶液を室温で60分間渦巻きを起こしながら反応させた。沈殿を生成することによって活性化を開始させた。糸を室温のFmoc-アミノ酸HOBTエステル溶液に入れ、バイアルを3分間振盪した。

### 【0067】

エンドキャッピング：糸を2%Ac<sub>2</sub>O/DMF溶液で2回すすぎ、各々の回に7mlであった。次いで、糸を室温の2%Ac<sub>2</sub>O/1%DIEA/DMFで30分間冷却し、DMFで4回及びCH<sub>3</sub>CNで4回すすぎ、各々の回に～7mlであった。

【0068】

脱保護：糸を室温の20%ピロリジン/DMF溶液中に25分間入れた。次いで、それをDMFで4回及びCH<sub>3</sub>CNで4回すすぎ、各々の回に～7mlであった。

【0069】

最終の脱保護：最終の脱保護をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中50%TFA中で2時間実施した。この手順が完了した時に、カップリング効率をニンヒドリンアセイによって求めた。結果は、下記の通りであった：

【0070】

【表1】

サンプル	糸1cm当たりの [アミン]	残留するアミン%	接合された% この工程
フランク糸	$1.02 \times 10^{-15}$	—	—
アミン結合された糸	$5.93 \times 10^{-1}$	100	—
エンドキャップした後、1接合	$6.52 \times 10^{-13}$	$1.1 \times 10^{-5}$	(100)
脱保護した後、1接合	$1.11 \times 10^{-9}$	1.9	2
エンドキャップした後、2接合	$9.04 \times 10^{-14}$	$1.5 \times 10^{-6}$	(100)
脱保護した後、2接合	$9.30 \times 10^{-10}$	1.6	84
脱保護した後、3接合	$6.56 \times 10^{-10}$	1.1	71
脱保護した後、4接合	$7.13 \times 10^{-10}$	1.2	109

## 【0071】

シリンダー上でのカップリング：

上で調製した糸を0.1%プロムフェノールブルー(BPB)／DMF中で2分間すすいだ。それを、次いでEtOHで4回及びCH<sub>3</sub>CNで4回すすぎ、各々糸3m当たり容積10mlを使用した。B P Bを糸に加え、糸を青色に変色させた。糸を選定したシリンダーの回りに巻き付けた。ブラックワックスを適用してシリンダーを1cmセクションに分割し、それでこれらのセクションを液表面にじりに対してシールし、糸1mの始めを糸読み機中に接続するために残した。ライブラリーの第一の部分を、それが再びライブラリーにおいて使用する第一のセクションになるように識別した。上記に記載した通りにカップリング工程で調製したFmoc-アミノ酸溶液をシリンダーの各々の幅1cmセクション上に約40(L/cm<sup>2</sup>)で置いた。30分後に、糸は、青色から緑黄色に変わり、カ

ップリングが完了したことを示した。この点で、吸収性組織で吸い取ることによって過剰の溶液を除き、カップリング試薬を一層加えた。30分後に、過剰の溶液を除き、もう30分間活性化されたアミノ酸を一層加えた。

#### 【0072】

この点で、糸をシリンダーから取り出した。エンドキャッピング及び脱保護を、糸全体を試薬溶液中に浸漬して上記に記載した通りにして実施した。各々の次のカップリングを、再び糸を特定のサイズのシリンダーの回りに巻き付けることによって実施した。

#### 【0073】

アミン濃度のニンヒドリンテスト：

試薬A、B及びCを下記の通りに造った：

試薬「A」：H<sub>2</sub>O中10<sup>-2</sup>MのKCN、ピリジン中100mlに希釈した

試薬「B」：EtOH 5.0ml中フェノール20.7g

試薬「C」：EtOH 10.0ml中ニンヒドリン、50g

#### 【0074】

100(L「A」、50(L「B」、及び25.0(L「C」をバイアルに加えた。アミンサンプルをこのバイアルに加えた。バイアルを100°Cで10分間加熱した。バイアルを、次いで0°Cで冷却した。溶液を、次いで60%EtOH/H<sub>2</sub>O 3.0mlで希釈した。UV-VIS吸光度読みを570nmで取った。

#### 【0075】

糸サンプル及び標準のアミンサンプルの両方のニンヒドリンテストを同時に行った。標準のアミンサンプルは、テトラエチレングリコールジアミンを60%EtOH/H<sub>2</sub>O中に、溶液中のアミン基の最終濃度が2×10<sup>-8</sup>～2×10<sup>-7</sup>の範囲になるように希釈することによって造った。

#### 【0076】

吸光度を、標準溶液の場合に濃度に対しつつ糸サンプルについて糸cmに対しプロットした。糸サンプルについての線の勾配を標準溶液についての線の勾配によって割ることにより、糸cm当たりのアミンのモルの値を得た。

## 【0077】

ストレプタビジンーフルオレセイン結合：

調製した糸ライブラリーを容積10mlを有するトリス緩衝液(pH7.4)で2回すすいだ。次いで、糸をNaCl(0.15M)/Tween20(0.04M)/トリス緩衝液(pH7.4)中BSA 1%中に浸漬し、1.5時間渦巻きを起こして糸上の非特定の結合部位をブロックした。ストレプタビジンーフルオレセイン接合されたストック溶液(1mg/ml、0.020ml)をこの溶液に加え、1.5時間渦巻きを起こした。

## 【0078】

糸読み：

フルオレセイン標識された糸ライブラリーを修正オーディオカセット中に装着し、テフロンチューブによって蛍光セルに接続した(図5)。一旦ライブラリーを適所に置いたら、糸を、修正テーププレイヤーを使用することにより、コンピューターを通して取り付けたA/Dボードを経てPMT出力を記録しながら引っ張った。ライブラリーを蛍光分光計によって488nmの励起及び535nmの発光において分析した。この読みを、不一致を求めるように何回も行った。これらの実験における蛍光出力信号を時間の関数として読んだ。各々のサンプルに対応する糸の領域は、ブラックワックスを使用して各々のサンプル領域を分離したことから、容易に求められた。糸それ自体は、わずかな蛍光を有し、それでブラックマーキングによる蛍光信号の均等に離間された負の偏差は、サンプルの間の分割を示した。蛍光最大量を識別し、それらがかなり均等に離間されかつ正しい数であるかを見るために調べ、次いで各々の最大をいずれの側での最少を超えるその値として記録した。データ中の各々のピークは、別々の化合物を表わし、ライブラリーの絶対の始まりは分かっているので、各々のピークのアイデンティティーは、ライブラリーの終わりからの距離を測定することによって簡単に求められた。この特定のライブラリーは、35の化合物の後に繰り返すことが知られていたので、35の反復時間上でピークを平均化することが可能であった(ピーク1は、36、71、等...で平均化される)。これは、各々のピーク高さについて一層信頼し得る値をもたらす。ピーク高さ対糸に沿う距離の生成したプロ

ットを図7に表わす。

### 【0079】

図7中のピークは、左から右に、下記の系列をこの順で表わす：

#### 【化4】

A1, B2, C3, D4, E5, A6, B7, 等...

ここで：

X1	X2
A=His	1=Ac Leu
B=Ser	2=Ac Phe
C=Asp	3=Bz
D=Ala	4=Ac
E=Phe	5=Ac His
	6=Ac Glu
	7=Ac Gly

### 【0080】

このライブラリーにおいて、予期される最も高いピークは、最後のアミノ酸位に His を表わすもの (X<sub>2</sub>-His-Pro-Gln-Phe-Ala-Ala-Ala-Ala-系) である。エンドキャッピング種は、一層小さい相違を生じるはずである。これらの予期される結果の両方が見られる。

### 【0081】

フーリエ変換分析：

系の読みから得られたデータを、上に概略した通りに、化合物当たり 2 点に減らした（各々の信号についての 1 点は、信号のいずれの側での谷よりも高い平均の増加として取り、かつ 1 点は、各々のピークの間で取る）。標準のアルゴリズムを用いた BASIC プログラムを使用してフーリエ変換 (FT) を行った。好適な実施態様では、FT は、共鳴すべきであり：基數 2 アルゴリズムは、それ程適していないことになり、データのそれ程適していないオーバーサンプリングを確実にした。所定のシリンダー上に設置した特定のアミノ酸の効能に対応する「波形」を下記の通りに抽出した。相対的な周波数におけるピークの実及び虚部を、すべての調波のように、周波数ドメインから抽出した。これらの値を、次いで一層小さなアレイ中に入れ、フーリエ変換して時間ドメインに戻した。生成した「

波形」は、そのシリンダー上に加えた官能基の各々について出力信号を表わす。

図7に示す35化合物ライブラリーの信号をフーリエ変換し、5及び7cmシリンダーに対応する波形をFTスペクトルから抽出した。これらの波形結合プロファイルを図8に示す。

### 【0082】

本明細書中に挙げる文献及び特許すべてを全体で援用する。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1A】

シリンダー上の糸の螺旋巻きを示す。

##### 【図1B】

シリンダーを3つの等しい領域に分割し、かつ各々の領域を異なるカップリング剤で処理することを示す。

##### 【図1C】

化合物を「A」、「B」、及び「C」によって表わす各々の領域に接合したシリンダーを断面で示す。

##### 【図1D】

化合物を「A」、「B」、及び「C」によって表わす各々の領域に接合した、生成した線形形態の糸を示す。

##### 【図2A】

糸を前に採用したよりも大きなシリンダーの回りに巻き付け、シリンダーを3つの等しい領域に分割し、かつ各々の領域を三種の異なるカップリング剤で処理することを示す。

##### 【図2B】

「D」、「E」、及び「F」によって表わす部分を新しく加えたシリンダーを断面で示す。

##### 【図2C】

化合物を今「AD」、「BE」、「CE」、「CF」、「AF」、等によって表わす糸の各々の部分に接合した、生成した線形形態の糸を示す。

##### 【図3】

2つの異なる直径を有するシリンダーを利用し、かつ分割を重なっていない領域を生じる各々のシリンダーについて同じ位置に置く好適な実施態様を示す。

【図4】

いかにして糸を読むかの総括スキームを示す。

【図5】

糸分析用に使用する修正オーディオカセットを示す。

【図6】

蛍光セルを示す。

【図7】

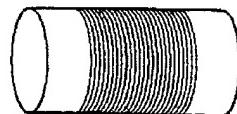
ライブラリーの分析からの時間平均したデータを示す。

【図8】

フーリエ変換から得られた結合プロファイルを示す。

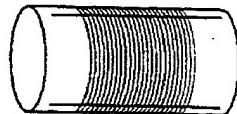
【図1A】

FIG.1A



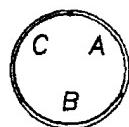
【図1B】

FIG.1B



【図1C】

FIG.1C



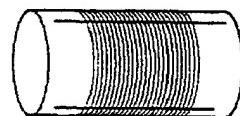
【図1D】

FIG.1D



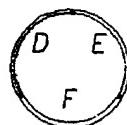
【図2A】

FIG.2A



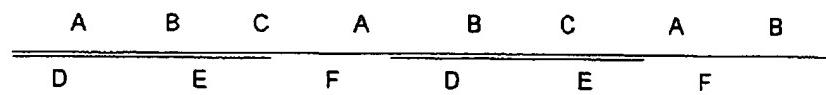
【図2B】

FIG.2B



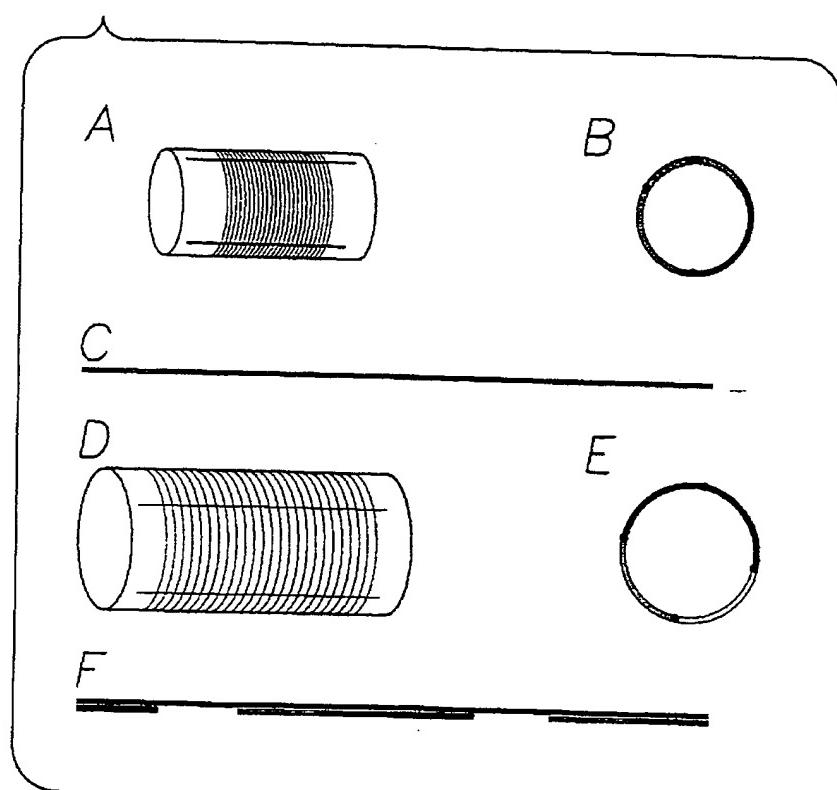
【図2C】

FIG.2C

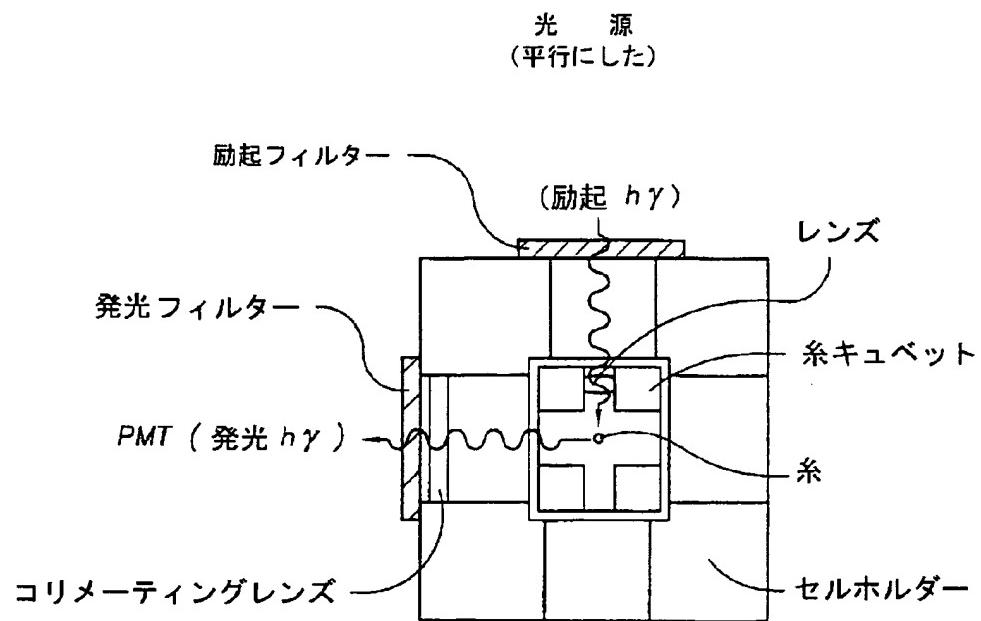


【図3】

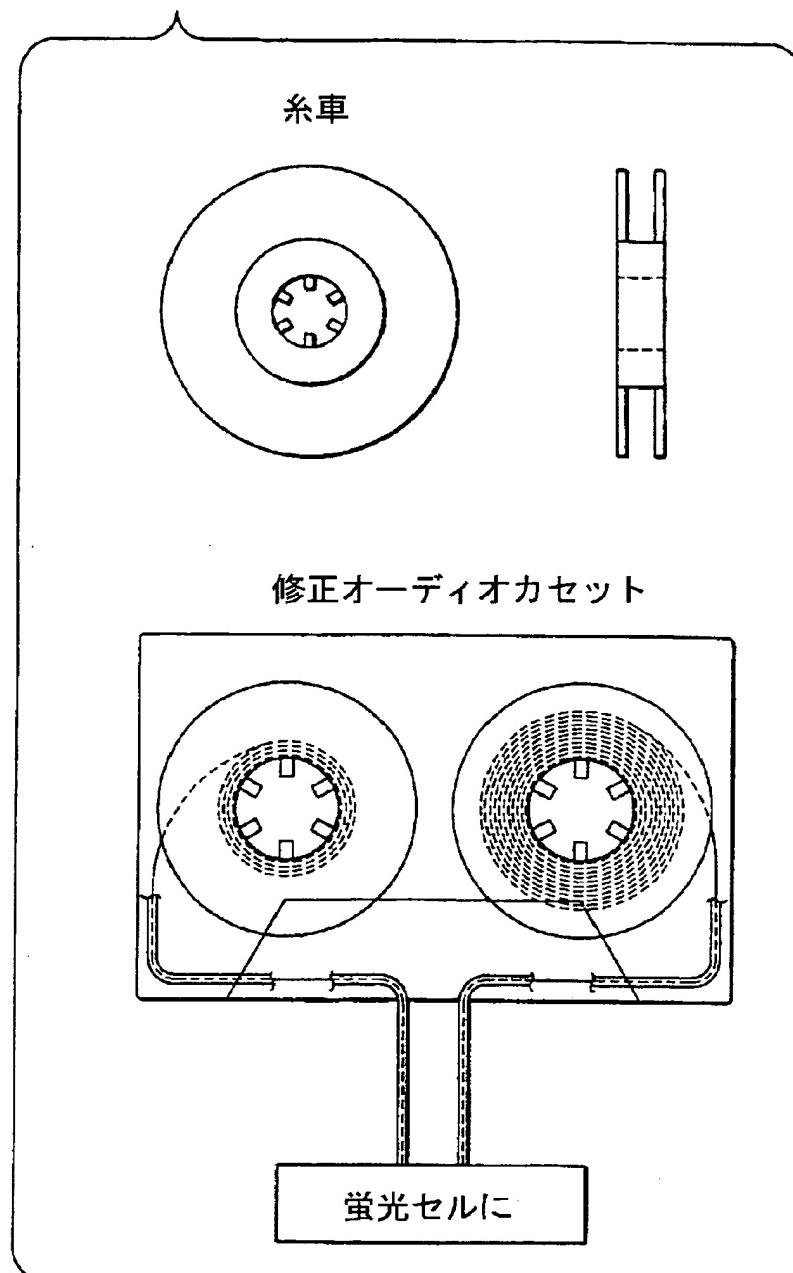
FIG.3



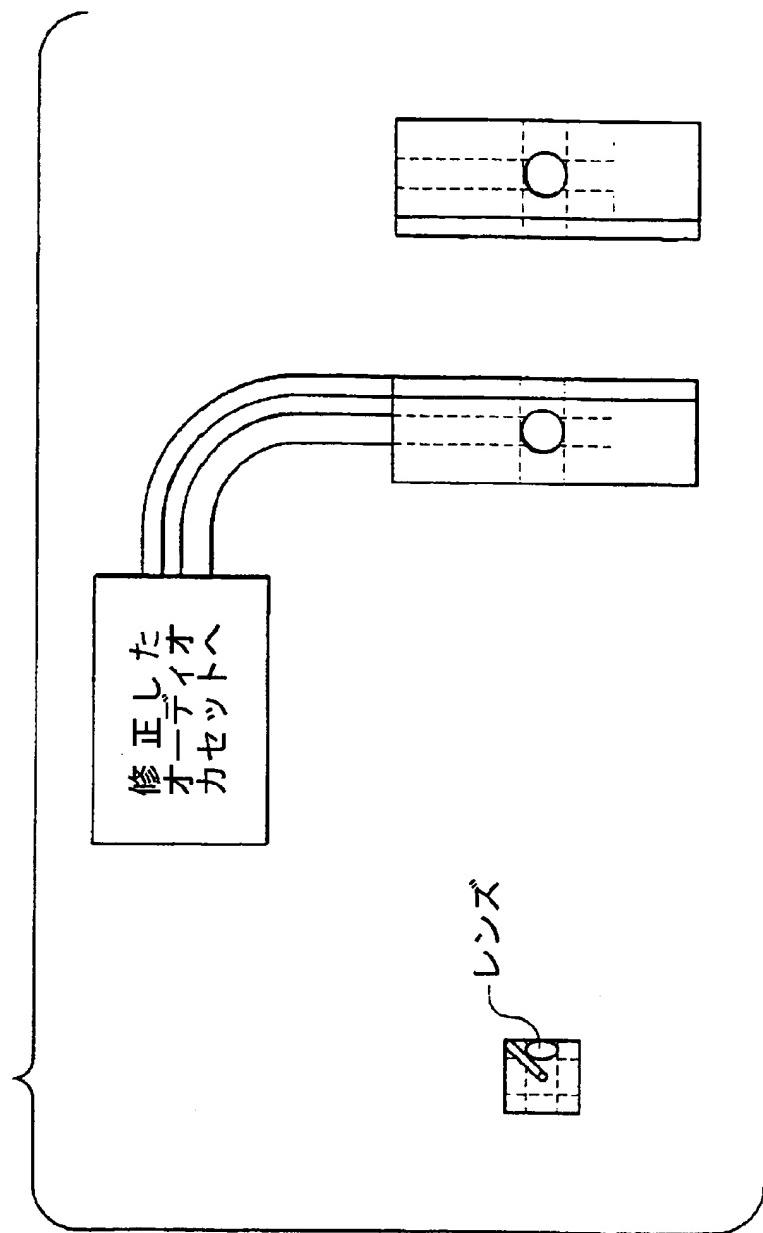
【図4】



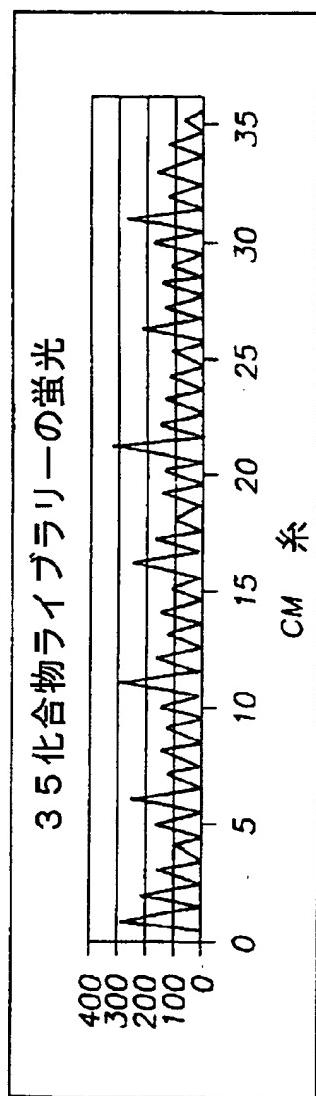
【図5】



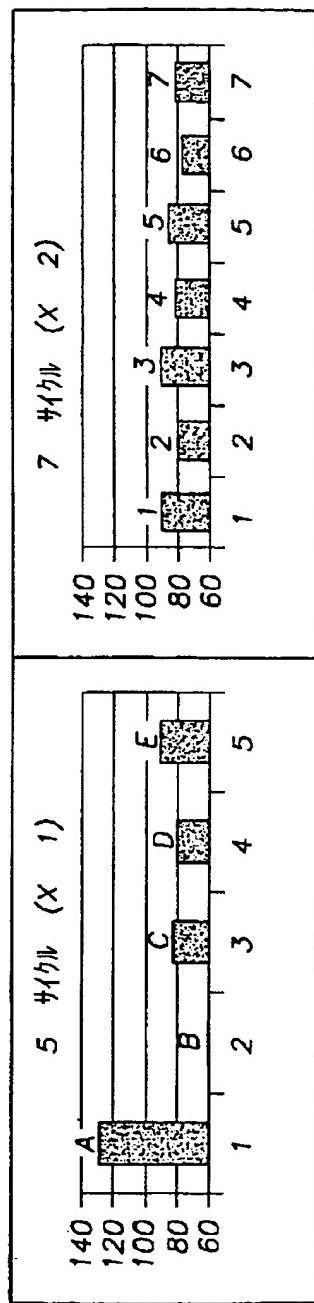
【図6】



【図7】



【図8】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/03707
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12Q 1/00, 1/58; G01N 21/84, 33/53, 33/56, 33/543, 33/544 US CL 356/429; 435/4, 6, 7.1; 436/501, 518, 528, 530 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 356/429; 435/4, 6, 7.1; 436/501, 518, 528, 530		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,527,681 A (HOLMES) 18 June 1996 (18.06.96), see Abstract, column 5, lines 19-27, column 6, lines 18-24, column 11, lines 27-end and Example A beginning in column 23.	1, 2, 5, 6, 8, 17, 18
X	US 5,445,934 A (FODOR et al) 29 August 1995 (29.08.95), see entire document, especially Abstract, Figures 17, 18A and 18B and columns 11-12.	1, 2, 5, 6, 8, 10-12
Y	US 5,688,696 A (LEBL) 18 November 1997 (18.11.97), see example 6.2.	1-10
Y	EP 0 385 433 A2 (LEBL et al) 05 September 1990 (05.09.90), see entire document, especially Abstract and Figure 1.	1-12 and 14-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents. "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claims, or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
** Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  14 MAY 1999	Date of mailing of the international search report  15 JUN 1999	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized Officer  MAURIE E. GARCIA Telephone No. (703) 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/03707
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEWITT et al. DIVERSOMER(tm) Technology: Solid Phase Synthesis, Automation and Integration for the Generation of Chemical Diversity. Drug Dev. Res. October 1994, Vol. 33, No. 2, pages 116-124, see page 117, column 1 and 122 column 2.	34-37
Y, P	US 5,807,754 A (ZAMBIAS et al) 15 September 1998 (15.09.98). See columns 11-12.	34-37
Y	US 5,030,841 A (WAMPFLER) 09 July 1991 (09.07.91), see column 1, lines 25-35 and column 2, lines 42-52.	34-37

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet)(July 1992)\*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/03707				
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b> <p>This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>     <li>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 13 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  There is no claim number 13 (this number was skipped).</li>     <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>						
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>Please See Extra Sheet.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input checked="" type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-18 and 34-37</li>     <li>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</li> </ol>						
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table border="0"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input checked="" type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.					
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.					

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/03707

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN (BIOSIS, Medline, CAPLus, SciSearch)

Author search; Search terms: combinatorial?, one dimensional, linear, array, string, fiber(libre), thread, chemical, synthesis, peptide, oligo?, compound, Fourier transformation, structures activity, interval, spatial, frequency

## BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-7, drawn to an array of chemical compounds attached to a support.

Group II, claims 8-18, drawn to a method of preparing an array of compounds.

Group III, claims 19-24, drawn to a (second) method for preparing a chemical array.

Group IV, claims 25-31, drawn to a method of measuring a property of each of the chemical compounds.

Group V, claims 32-33, drawn to a method of assaying chemical compounds for binding to fluorescent species.

Group VI, claims 34-37, drawn to a method of obtaining structure-activity relationships.

The inventions listed as Groups I-VI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:  
 The technical relationship among the inventions is the array of compounds attached to a support, wherein each compound is attached to a predetermined portion of the support. Arrays (or libraries) of compounds such as this are well-known in the art. See US 5,688,696 (LEBL, Michal) 10 November 1997 (10.11.97), entire document, especially Example 6.2 which shows synthesis of a library of compounds on cotton string. Additionally see, EP 0385433 A2 (CESKOSLOVENSKA AKADEMIE VED) 5 September 1990 (05.09.90), entire document, especially Abstract and figure 1 which show synthesis of compounds utilizing an "elongated, preferably band-like carrier" which is shown in figure 1 as reference numeral 1.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	識別記号	F I	マークド(参考)
// C 0 7 K 17/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	F

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ,  
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K  
E, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM  
, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  
, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,  
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, D  
K, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR  
, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP,  
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ  
, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U  
Z, VN, YU, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA11  
HA11  
4B029 AA07 AA23 BB16 BB20 CC03  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ21 QQ42  
QQ52 QQ79 QR66 QR82 QS03  
QS36 QS39 QX02  
4H045 AA50 EA50 FA33

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**